Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité
Nom : Numéro de place :
Prénom : Numéro de salle :

AGREGATION DES SCIENCES DE LA VIE
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
TRAVAUX PRATIQUES DE SPECIALITE A

Concours externe 2003

Durée totale 6 heures

Consignes générales

L'épreuve est constituée de 2 exercices indépendants. La partie expérimentale correspond à l'exercice 1.

Attention : Pour permettre les passages aux différents appareils utilisés pour l'exercice 1, **chaque candidat devra commencer la partie expérimentale à un moment précis** indiqué dans la **feuille annexe** de l'exercice 1 (tenir compte de votre numéro de paillasse). Les plages vides de manipulations seront utilisées pour l'exercice 2 et pour répondre aux questions de l'exercice 1.

Exercice 1. Etude expérimentale des mécanismes photochimiques de la photosynthèse dans des chloroplastes de feuilles d'épinard.

barème : 28 / 40

lecture du sujet : 15 minutes

durée des expériences (*) : 2h45

durée des questions associées (**) : 1h30

19 pages incluant 1 liste du matériel nécessaire (page 19)

(*) Les parties réellement expérimentales de cet exercice correspondent aux parties A, B, C et D1 qui seront faites dans l'ordre précisé en annexe. Seuls les calculs demandés dans les questions 2 et 3 (partie B) sont nécessaires au bon déroulement de la partie expérimentale D1.

(**) Mis à part les questions 2 et 3, vous pourrez répondre aux autres questions en dehors de cette période expérimentale et dès que possible.

Exercice 2. Etude de mutants non photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardii.*

barème : 12 / 40

durée: 1h 30

8 pages incluant 2 annexes (page 8).

AVANT DE RENDRE VOTRE COPIE, PRIERE DE VERIFIER QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUE VOS NOM, PRENOM ET NUMEROS DE PLACE ET DE SALLE, EN TETE DE CHAQUE PARTIE.

Exercice 1. Etude expérimentale des mécanismes photochimiques de la photosynthèse dans des chloroplastes de feuilles d'épinard.

Vous commencerez cet exercice au temps indiqué sur la feuille annexe. Pour les différentes parties de cet exercice, vous devez respecter une plage horaire d'accès aux appareils (feuille annexe). L'exercice est composé de 4 parties A, B, C et D.

Pendant les 15 premières minutes, lire le sujet et faire, en même temps, pour votre organisation, un schéma de manipulation. Identifier vos plages horaires pour l'ensemble de l'exercice. Identifier le matériel sur la paillasse (voir liste page 19).

Partie A : Préparation des chloroplastes à partir de feuilles d'épinard (durée de manipulation : 45 minutes)

Suivre le protocole ci-dessous en tenant compte du temps imparti (feuille annexe).

Pour toute centrifugation, vérifier que votre numéro de paillasse est inscrit sur vos tubes.

1. 20g de feuilles d'épinard ont été pesés préalablement et mis à tremper dans de l'eau. Essuyer soigneusement les feuilles avec du papier absorbant.

2. Retirer (aux ciseaux) le pétiole et la nervure principale de chaque feuille puis découper les limbes en segments les plus petits possible.

3. Mettre immédiatement les fragments dans le mortier [préalablement placé sur glace].

4. Prélever 20mL de milieu SBN dans une éprouvette. Le milieu SBN contient du saccharose 0,4mol. L^{-1}, du tampon Bicine 50mmol. L^{-1} et du NaCl 10mmol. L^{-1} et a été ajusté à pH 7,8. **5.** Broyer les feuilles pendant 1 minute avec la moitié du milieu SBN contenu dans l'éprouvette.

6. Ajouter progressivement le reste du milieu SBN en broyant pendant 2 minutes.

7. Filtrer le broyat sur gaze (2 épaisseurs) et coton en retenant le maximum de débris dans le mortier et en recueillant le filtrat dans un erlenmeyer (100mL) préalablement refroidi dans la glace pilée.

8. Prélever 20mL de milieu SBN dans l'éprouvette.

9. Broyer à nouveau les résidus pendant 2 minutes en ajoutant progressivement les 20mL de milieu SBN. Filtrer ce broyat (avec les résidus) en récupérant le deuxième filtrat dans le même erlenmeyer que précédemment. Presser la gaze pour en extraire le maximum de liquide.

10. Prélever, après homogénéisation, 35mL de filtrat avec l'éprouvette et les introduire dans un tube de centrifugation (tube à vis). Identifier le tube avec votre numéro de paillasse.

11. Centrifuger à 500g pendant 2 minutes. Pendant ce temps, rincer et égoutter correctement l'éprouvette (pas d'eau résiduelle !); jeter le reste de filtrat.

12. Préparer un tube de centrifugation propre identifié avec votre numéro de paillasse. Après centrifugation, transvaser le surnageant de la première centrifugation dans l'éprouvette [en prenant soin d'entraîner le minimum de culot : attention, le culot est facilement décollable !] et compléter si nécessaire à 35mL avec du milieu SBN. Transvaser le contenu de l'éprouvette dans le tube de centrifugation.

13. Centrifuger à 4000g pendant 3 minutes. Pendant ce temps, rincer et égoutter correctement l'éprouvette (pas d'eau résiduelle !).

14. Après centrifugation, éliminer le surnageant en le versant dans l'erlenmeyer utilisé précédemment pour le filtrat (il sert maintenant de poubelle). Prélever 35mL de milieu SBN dans l'éprouvette propre. Sur le culot resté dans le tube de centrifugation, verser environ le tiers du milieu SBN contenu dans l'éprouvette et remettre délicatement le culot en suspension en vous servant d'une pipette (type Pasteur) en plastique. Lorsque la suspension est homogène, ajouter le reste des 35mL de milieu SBN. Agiter doucement le tube.

15. Centrifuger à 4000g pendant 3 minutes.

16. Après centrifugation, éliminer le surnageant en le versant dans l'erlenmeyer utilisé comme poubelle. Ajouter précisément 2mL de milieu SBN dans le tube de centrifugation et remettre le culot en suspension en vous servant d'une nouvelle pipette (type Pasteur) en plastique.

17. La suspension homogène est appelée **SC**, elle sera conservée à 4°C (dans la glace) et à l'obscurité (entourer le tube de papier d'aluminium) pendant le reste de la séance.

Remarques pour les parties suivantes:

- la suspension **SC** (qui ne pourra être refaite !) sera utilisée **pour différentes expériences**. Pour les cas où vous devrez diluer, ne prélever qu'un volume minimum si aucune indication n'est fournie.

- avant toute utilisation de la suspension SC, penser à l'homogénéiser correctement au préalable.

18. Une fois cette partie terminée, mettre votre vaisselle dans une bassine prévue à cet effet. Pour les parties suivantes, ne conserver dans la glace que le tube de centrifugation contenant la suspension SC et le reste de milieu SBN.

Suivant votre n° de paillasse, vous poursuivrez par la partie B ou la partie C, chacune durant au maximum 30 minutes. Puis pendant les 30 minutes suivantes, vous alternerez (voir feuille annexe) de manière à ce que les parties B et C soient terminées en 1h.

NB : Seules les questions 2 et 3 (partie B) sont nécessaires à la réalisation de la partie D.

Partie B. Dosage des chlorophylles (durée de manipulation : 30 minutes dont 15 minutes maximum au spectrophotomètre)

Chaque candidat dispose d'une plage horaire fixe d'accès à la centrifugeuse et aux spectrophotomètres (donnée en feuille annexe).

1. Préparer 2 tubes Eppendorf, l'un contenant 20µL et l'autre 40µL de suspension SC. Ajouter, dans chaque tube, 1,2mL d'acétone pur (*) et compléter, dans chaque cas, à 1,5mL avec de l'eau déminéralisée (ED). Identifier les 2 tubes Eppendorf avec votre numéro de paillasse.

(*) Attention, l'acétone est un solvant organique, les précautions suivantes sont exigées : (i) ne prélever ni « à la bouche » ni à la micropipette automatique : utiliser une pipette en verre (2mL) et une propipette. (ii) par la suite, tout mélange ayant contenu de l'acétone (même dilué) ne devra pas être jeté à l'évier, mais dans un flacon noté « déchets acétone », prévu dans la salle près des spectrophotomètres.

2. Centrifuger à 13000 tours/minute pendant 3 minutes. Pendant ce temps, dans le troisième tube Eppendorf, préparer un mélange qui servira de blanc pour le réglage du zéro d'absorbance au spectrophotomètre. Préciser la composition du blanc dans le tableau ci-dessous.

3. Après centrifugation, transvaser les deux surnageants acétoniques obtenus ainsi que le blanc dans les 3 cuves de spectrophotomètre : les couvrir de papier d'aluminium et les conserver à température ambiante en attendant le passage au spectrophotomètre.

4. Lors du passage au spectrophotomètre, régler l'appareil à 652nm. Faire le réglage du zéro d'absorbance avec le blanc puis mesurer l'absorbance de chaque surnageant acétonique (A_{652nm}). Indiquer les valeurs dans le tableau ci-dessous.

5. Régler le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 645nm. Faire le réglage du zéro d'absorbance avec le blanc puis mesurer l'absorbance de chaque surnageant acétonique (A_{645nm}). Indiquer les valeurs dans le tableau ci-dessous. Répéter l'opération en réglant le spectrophotomètre à 663nm.

Ce tableau doit être rempli au stylo bille (non effaçable) et vérifié par les surveillants lors du passage au spectrophotomètre.

Volume SC (µL)	20	40
Composition du blanc utilisé		
A_{652nm}		
A_{645nm}		
A_{663nm}		

Les concentrations en chlorophylles totales (chlorophylles a + b), en chlorophylles a et en chlorophylles b sont déterminées selon le principe d'un dosage colorimétrique, en utilisant la loi de Beer-Lambert qui donne la relation entre absorbance (A) à la longueur d'onde spécifique et la concentration en chlorophylles (C).

$A = \varepsilon\, d\, C$ d étant le trajet optique parcouru par la lumière au travers de la solution.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

L'absorbance à 652nm permet de déterminer les concentrations en chlorophylles totales (C_{a+b}).

Question 1. Indiquer pour quelle raison la longueur d'onde spécifique des chlorophylles totales est 652nm.

Question 2. Ecrire la relation entre concentration en chlorophylles totales (C_{a+b}) et absorbance à 652nm sachant que le coefficient d'absorption spécifique des chlorophylles totales à 652nm : $\varepsilon_{(a+b)652nm}$ = 34,5 pour une concentration exprimée en mg /mL et un trajet optique de 1cm.

Question 3. En déduire la concentration en chlorophylles totales (C_{a+b}) exprimée en mg/mL de suspension. Indiquer les valeurs dans le tableau récapitulatif de la page 7.

Les absorbances à 645nm et 663nm permettent de déterminer les concentrations en chlorophylles a (C_a) et en chlorophylles b (C_b).

Question 4. Etablir les formules donnant les concentrations en chlorophylles a (C_a) et en chlorophylles b (C_b) en fonction des absorbances à 645 et 663 nm sachant que les coefficients d'absorption spécifiques ε des chlorophylles a et b, pour des concentrations en mg /mL et un trajet optique de 1cm, varient suivant les longueurs d'onde et le pigment considéré :

$\varepsilon_{a\ 645nm} = 16$ $\varepsilon_{a\ 663nm} = 82$ $\varepsilon_{b\ 645nm} = 45{,}6$ $\varepsilon_{b\ 663nm} = 9{,}27$

Utiliser si nécessaire, le verso de cette feuille pour répondre à la question

Question 5. En déduire les concentrations en chlorophylles a (C_a) et en chlorophylles b (C_b) exprimées en mg/mL de suspension. Indiquer les valeurs de concentration ainsi que le rapport des concentrations (C_a / C_b) dans le tableau récapitulatif ci-dessous.

Volume SC (µL)	20	40	
C_{a+b} (mg/mL)			
C_a (mg/mL)			
C_b (mg/mL)			
C_a / C_b			

Une fois cette partie terminée, jeter les surnageants acétoniques (* voir remarque précédente). Mettre votre vaisselle dans la bassine prévue à cet effet. Pour les parties suivantes, ne conserver, dans la glace, que le tube de centrifugation contenant la suspension SC et le reste du milieu SBN.

Partie C. Numération des chloroplastes (durée de manipulation : 30 minutes)

Commencer cet exercice au temps indiqué sur la feuille annexe.

Pour la numération, utiliser une lame de numération Kova (en plastique et jetable). Chaque lame comporte 10 cupules numérotées et sur chaque cupule est insérée une lamelle. Chaque cupule possède 1 grille subdivisée en 9 carrés eux-mêmes subdivisés en 9 petits carrés (carrés élémentaires). Les quadrillages ont des dimensions précises : les carrés élémentaires ont 300µm de côté. La profondeur est de 0,11mm.

1. En utilisant une pipette automatique, introduire par capillarité, entre lame et lamelle et au niveau de l'encoche, 6µL de suspension de chloroplastes SC dans une des 10 cupules. La goutte ne doit pas déborder de la cupule et doit recouvrir, complètement et d'un seul coup, toute la surface quadrillée.

2. Au microscope, faire la mise au point sur la grille et compter le nombre de chloroplastes présents par carré élémentaire.

3. Si une dilution est nécessaire, diluer la suspension de chloroplastes (SC) avec du milieu SBN. Attention la dilution doit être faite dans des tubes Eppendorf de 2mL et en n'utilisant pas plus que 50µL de suspension SC pour cette partie C.

Question 6. Donner le résultat de cette numération en indiquant le protocole utilisé et en détaillant les calculs.

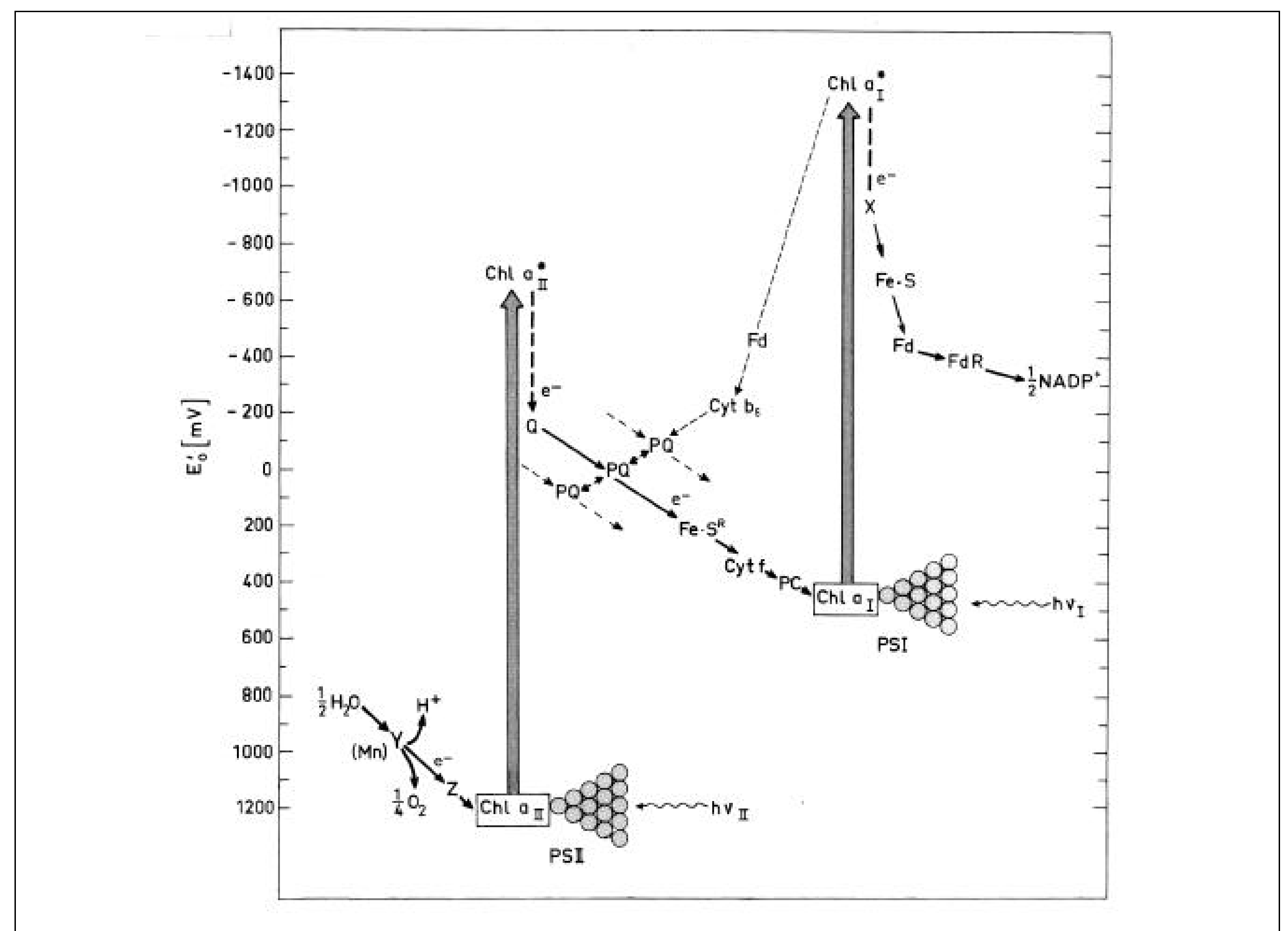
Pour les parties suivantes, ne conserver, dans la glace, que le tube de centrifugation contenant la suspension SC. Le milieu SBN peut maintenant être conservé à température ambiante.

Partie D. Réactions photochimiques de la photosynthèse

On se propose d'étudier expérimentalement les 2 étapes photochimiques importantes de la photosynthèse : d'une part, le transfert d'électrons (paragraphe D1) et d'autre part le transfert de protons (paragraphe D2).

D1. Transfert photosynthétique d'électrons (durée maximum 45 minutes dont 30 minutes maximum au spectrophotomètre).

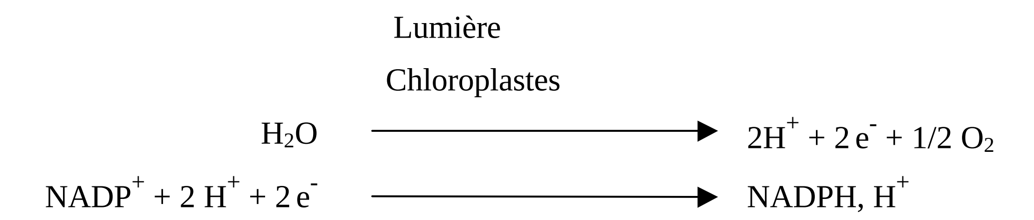
Le document ci-dessous vous indique le trajet des électrons via les différents composants de la chaîne photosynthétique (schéma en Z).



Trajet des électrons dans la photosynthèse. Les différents composants de la chaîne photosynthétique sont positionnés par rapport à l'échelle des potentiels d'oxydoréduction. (M. Schopfer, 1995. Plant Physiology, Springer Verlag.).

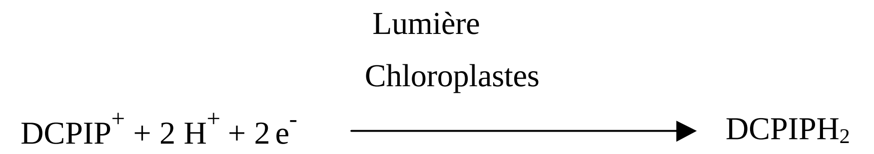
PQ = plastoquinone, chla = chlorophylle a, PC = plastocyanine, Fd = ferredoxine.

Le but de cette expérience est de mesurer le transfert photosynthétique d'électrons à différentes conditions lumineuses. Le principe de la mesure dérive de celui mis en évidence par R. Hill. L'expérience de Hill a montré la nécessité d'un accepteur d'électrons qui, dans les chloroplastes intacts, est le $NADP^+$:



Lors de la préparation, l'enveloppe des chloroplastes peut être altérée, l'accepteur endogène est alors abondamment dilué. De ce fait, la chaîne photosynthétique est bloquée : l'apport d'un accepteur exogène d'électrons permet de rétablir le processus, ce qui se traduit par une réduction de l'accepteur et par un dégagement d'oxygène à la lumière.

On utilisera comme accepteur d'électrons le dichlorophénol indophénol (DCPIP) (E'o = 0,217V). Cet indicateur d'oxydoréduction a la propriété d'être bleu à l'état oxydé et incolore à l'état réduit. La réduction du DCPIP se traduira par une baisse de l'absorbance à 600nm.



1. Diluer une partie de la suspension SC avec du milieu SBN pour obtenir 2,5mL de suspension diluée à 100µg de chlorophylles totales /mL (cette suspension est appelée **SD1**). Faire la dilution dans un pilulier placé au froid (dans la glace) et à l'obscurité (entouré de papier d'aluminium) pendant toute la durée de la partie D1.

2. Préparer 7 cuves de spectrophotomètre (trajet optique de 1cm) contenant chacune 2,5mL de milieu SBN et 0,3mL d'une solution de DCPIP 5,5. 10^{-4}M. Préparer également une série de carrés de parafilm qui serviront à homogénéiser correctement les cuves.

3. A la plage horaire fixée, passer au poste près du spectrophotomètre et préparer la première cuve qui va servir de blanc pour les mesures d'absorbance à 600nm. Dans cette cuve, ajouter quelques cristaux (pointe de spatule) d'hydrosulfite de sodium puis agiter : il faut obtenir une complète décoloration du DCPIP [l'hydrosulfite de sodium est un réducteur permettant de réduire chimiquement et instantanément le DCPIP]. Ajouter ensuite 0,2mL de SD1. Agiter correctement et faire le réglage du zéro d'absorbance à 600nm avec cette cuve.

4. En procédant ensuite cuve par cuve, procéder aux étapes suivantes pour les 6 autres cuves :

4a. placer un porte-cuve à une condition lumineuse précisée ci-dessous. Allumer la lampe.

4b. ajouter 0,2mL de SD1. Agiter rapidement et correctement (parafilm) puis mesurer immédiatement l'absorbance à 600nm (cette valeur sera celle du temps zéro).

4c. placer ensuite rapidement la cuve sur le porte-cuve devant la lampe puis mesurer l'absorbance de la cuve toutes les 30 secondes pendant 2 minutes en replaçant la cuve à la lumière entre chaque mesure. La mesure d'absorbance ne doit pas prendre plus que 10 secondes. Il n'est pas nécessaire de vérifier le blanc entre chaque mesure. Ne pas arrêter le chronomètre pendant les 2 minutes de mesure. Bien repérer le sens du faisceau lumineux dans le spectrophotomètre et toujours positionner les cuves correctement.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

Les cuves vont être exposées à différentes conditions lumineuses précisées au moment de l'expérience. Indiquer ci-dessous et dans le tableau les intensités lumineuses préréglées dans la salle par les surveillants.

Pour les cuves 2 et 3 : les cuves sont exposées à lux

Pour les cuves 4 et 5 : les cuves sont exposées à lux

Pour les cuves 6 et 7 : les cuves sont placées dans l'enceinte obscure. Ne sortir la cuve que pour la mesure d'absorbance qui doit être faite le plus rapidement possible.

Utiliser le tableau ci-dessous pour noter les valeurs d'absorbance obtenues. **Ce tableau doit être rempli au stylo bille (non effaçable) et vérifié par les surveillants lors du passage au spectrophotomètre.**

	n° cuve	2	3	4	5	6	7
Intensité lumineuse (lux)						obscurité	
A_{600nm}		2	3	4	5	6	7
	temps 0						
	30 sec.						
	60 sec.						
	90 sec.						
	120 sec.						

Question 7. Pour les différentes conditions expérimentales, représenter sur papier millimétré la variation d'absorbance à 600nm en fonction du temps. Pour les questions suivantes, utiliser les valeurs absolues correspondant à ces variations .

Question 8. Déterminer, en fonction de l'intensité lumineuse, la vitesse de réduction photosynthétique du DCPIP par mg de chlorophylles. Le coefficient d'absorption spécifique (ε) du DCPIP à 600nm est ε_{600nm} = 1,64 10^4 pour une concentration en DCPIP de 1 mole/L et un trajet optique de 1 cm. Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Question 9. Dans des cuves préparées comme précédemment, lorsque l'on ajoute du DCMU (dichlorophényl-1,1-diméthylurée), la vitesse de réduction du DCPIP est nulle même en conditions lumineuses saturantes. Préciser quelle propriété du DCPIP au niveau de la chaîne photosynthétique, l'expérience en présence de DCMU met en évidence.

Question 10. Quelle autre technique, utilisant également un accepteur artificiel d'électrons, pourriez-vous proposer pour mesurer l'efficacité de transfert d'électrons à la lumière ? Proposer un protocole et montrer l'intérêt de cette technique par rapport à celle utilisée pour l'épreuve.

D2. Transfert de protons à la lumière.

Pour cette partie, l'expérience ne sera pas réalisée, vous disposez de résultats qu'il faudra exploiter en répondant aux questions posées.

On souhaite mettre en évidence la variation de pH se déroulant à la lumière dans les compartiments chloroplastiques.

Pour que la chaîne photosynthétique soit fonctionnelle à la lumière, on utilise un autre accepteur d'électrons : le PMS ou phénazine methosulfate (E'o = - 0,03V).

Pour cette expérience, une suspension SC a été diluée avec une solution de NaCl 10mM pour obtenir une suspension diluée à 0,5mg de chlorophylles totales/mL (**SD2**).

Deux tubes contenant chacun 4,5mL d'un milieu réactionnel MR [NaCl 100mmol.L^{-1}, PMS 20µmol.L^{-1}] ont été préparés.

Pour chaque tube entouré de papier d'aluminium, 0,5mL de SD2 ont été ajoutés.

L'électrode d'un pH-mètre a été immergée dans le mélange et le pH a été ajusté à pH 6,3.

Une mesure du pH après 2 minutes à l'obscurité a permis de vérifier la stabilité du pH.

La préparation a ensuite été éclairée à 5000 lux et le pH a été à nouveau mesuré après 2 minutes à la lumière.

La préparation a finalement été placée à l'obscurité et le pH a été mesuré après 2 minutes à l'obscurité.

Les variations pH obtenues pour les deux essais sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

traitement	essai durée	1	2
obscurité	2 min	6,30	6,29
lumière	2 min	6,58	6,59
obscurité	2 min	6,32	6,31

Question 11. Sachant que l'osmolarité des chloroplastes est en moyenne de 0,5 osmoles. L^{-1}, indiquer l'état des chloroplastes de la dilution SD2. Justifier votre réponse.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

Question 12. Expliquer la variation de pH obtenue à la lumière.

Question 13. Déterminer le nombre de micro-équivalents H^+ [par mg de chlorophylles et par minute] mis en jeu au cours de la variation de pH à la lumière.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

Question 14. *In vivo*, quelles sont les conséquences de cette variation de pH à la lumière ?

Question 15. Préciser quelles expériences pourraient être réalisées pour mettre en évidence ces conséquences. Proposer des protocoles.

Utiliser si nécessaire, le verso de cette feuille pour répondre à la question

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

<u>Matériel nécessaire à la réalisation de l'exercice 1 et présent sur la paillasse de chaque candidat.</u>

Une calculatrice (un mode d'emploi est disponible dans chaque salle)
Pipettes automatiques 20µL, 100(ou 200)µL, 1mL, 10 cônes jaunes et 10 cônes bleus.
Papier parafilm, papier aluminium, papier absorbant.

Partie A.

Glace pilée, mortier + pilon [sur glace]., éprouvette (50mL), 1 erlenmeyer (100mL).
20g de feuilles d'épinard dans bassine d'eau.
200mL milieu SBN saccharose 0,4mol. L^{-1}, du tampon Bicine 50mmol. L^{-1} et du NaCl 10mmol. L^{-1} à pH 7,8.
1 entonnoir + gaze (2 épaisseurs) et coton.
2 tubes de centrifugation à vis portant le numéro de paillasse.
2 pipettes (type Pasteur) en plastique, 1 carré de papier d'aluminium (environ 20 x 23 cm).

Partie B.

3 tubes Eppendorf de 2mL, 3 cuves de spectrophotomètre (<u>contenance 1mL</u>) + porte cuve.
Acétone pur et eau déminéralisée (ED).
<u>Pour prélever l'acétone</u> : 1 pipette en verre de 2mL + pro-pipette.

Partie C.

Une lame de numération Kova, microscope.
4 tubes Eppendorf de 2mL, milieu SBN.

Partie D1.

Milieu SBN, solution de DCPIP 5,5. 10^{-4}M [dans un flacon brun], 1 pilulier [sur glace], papier d'aluminium et parafilm
7 cuves de spectrophotomètre (<u>contenance 3mL</u>) + porte cuve.

<u>Matériel en commun</u>

Pour la partie A : 1 centrifugeuse pour tubes à vis (500g et 4000g)
Pour la partie B : 1 centrifugeuse pour tubes Eppendorf (13000 tours/minute) et 1 spectrophotomètre
Pour la partie D1 près de chaque spectrophotomètre :
1 porte cuve
1 flacon contenant des cristaux d'hydrosulfite de sodium + une spatule
1 lampe 60W sur support
1 enceinte obscure : 1 bécher ou flacon de 50mL recouvert de plastique noir + 1 pot noir.
1 luxmètre

<u>Matériel demandé aux candidats</u>

1 paire de petits ciseaux
1 montre chronomètre
1 marqueur indélébile

Exercice 2 :
Etude de mutants non photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardii.*

Chlamydomonas reinhardii est une algue verte unicellulaire à cycle haplophasique. C'est une espèce hétérothallique, la fécondation ne pouvant se produire qu'entre parents de types conjuguants différents, notés *mt*+ et *mt*-. Les cellules sont caractérisées par la présence d'un chloroplaste unique, de grande taille. L'algue est capable d'autotrophie et d'hétérotrophie vis-à-vis du carbone suivant les conditions de culture : elle est phototrophe mais peut se développer à l'obscurité à partir d'un substrat organique, par exemple l'acétate. Des mutants non-photosynthétiques peuvent donc être maintenus sur un milieu contenant de l'acétate.

On se propose d'étudier certains mutants incapables de réaliser la photosynthèse, sélectionnés pour leur exigence en acétate. Le phénotype « exigeant en acétate» sera noté [ac-] et le phénotype sauvage, « non exigeant en acétate», [ac+]. On s'intéressera en particulier à un de ces mutants, affecté au niveau de la Rubisco.

NB : En annexe figurent quelques données que vous utiliserez lorsque vous le jugerez nécessaire.

1. Analyse génétique.

Plusieurs mutants [ac-] ont été obtenus. Pour chacun, on dispose de souches de chacun des types sexuels *mt*+ et *mt*-.

On a croisé chaque mutant avec la souche sauvage et analysé la composition des tétrades de la descendance. Pour chaque mutant, deux croisements réciproques ont été réalisés, [*mt*+, ac+]x [*mt*-, ac-] et [*mt*+, ac-]x [*mt*-, ac+]. Les résultats obtenus permettent de classer les mutants en deux catégories, A et B (Tableau 1).

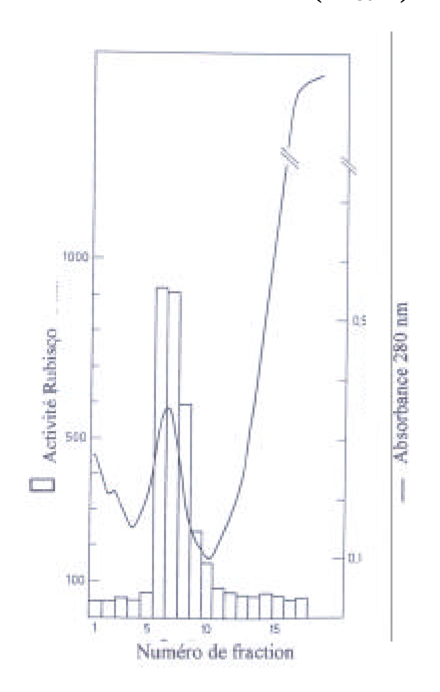
Tableau 1 : Composition des tétrades de la descendance de différents croisements.
(Pour chaque croisement, environ 20 tétrades ont été analysées : elles ont toutes la composition indiquée dans le tableau.)

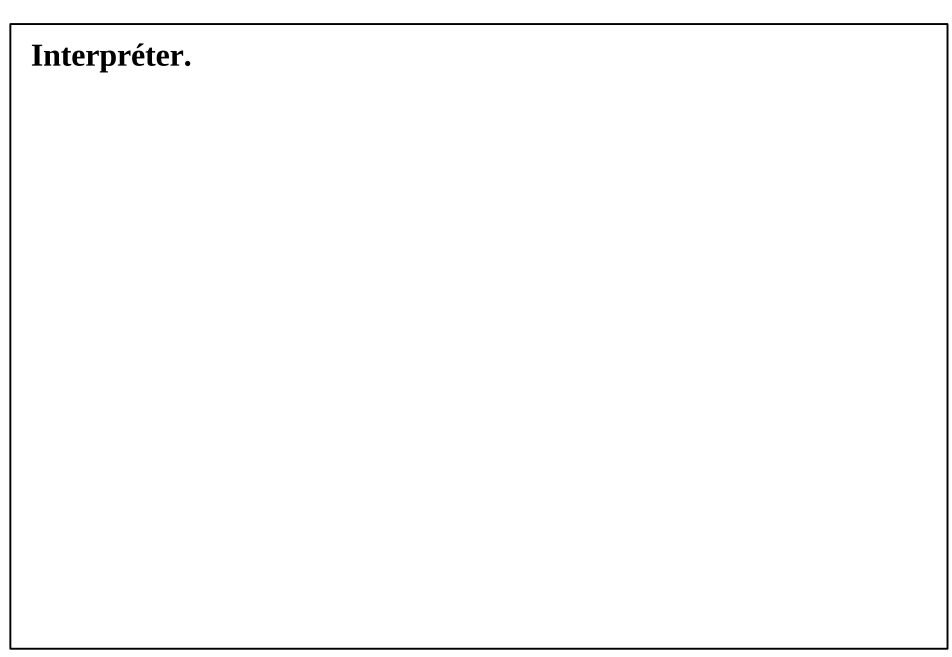
Catégorie de mutant [ac-]	Phénotype du parent *mt*+	Phénotype du parent *mt*-	Nombre de méïospores par tétrade de phénotype : [ac+]	[ac-]	*mt*+	*mt*-
Catégorie A	ac+	ac-	2	2	2	2
	ac-	ac+	2	2	2	2
Catégorie B	ac+	ac-	4	0	2	2
	ac-	ac+	0	4	2	2

Analyser ces résultats. Indiquer en particulier le mode héréditaire du caractère [ac+]/[ac-] et les hypothèses que l'on peut formuler quant au déterminisme génétique du phénotype [ac-] pour les mutants de chaque catégorie.

2. Structure de la Rubisco.

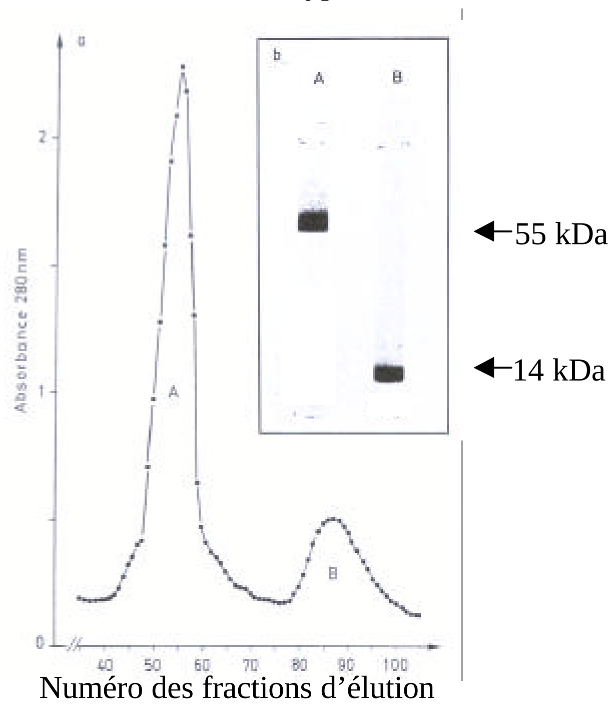
2.1. Des extraits solubles d'une culture de la souche sauvage de *Chlamydomonas* ont été chargés sur un gradient de saccharose et centrifugés 17h à 150 000g. La figure ci-dessous représente l'absorbance à 280nm (A_{280nm}) ainsi que l'activité Rubisco mesurées dans chacune des fractions.




Interpréter.

2.2 La position de la fraction 7 dans le gradient de saccharose précédent permet de lui attribuer un coefficient de sédimentation de 18S, qui correspond à une masse moléculaire de l'ordre de 550kDa.

Une aliquote de cette fraction 7 est passée sur une colonne Sephadex en présence de Sodium Dodécylsulfate (SDS). Le résultat d'élution est donné dans la figure suivante (**a**). Les fractions des pics A et B sont ensuite soumises à électrophorèse (**b**). Par ailleurs, un dosage a montré que, dans la Rubisco fonctionnelle, les deux types moléculaires sont en quantité équimolaire.



Exploiter ces résultats pour donner le plus de précisions possible sur les structures primaire et quaternaire de la Rubicso.

3. Etude d'un mutant de la Rubisco.

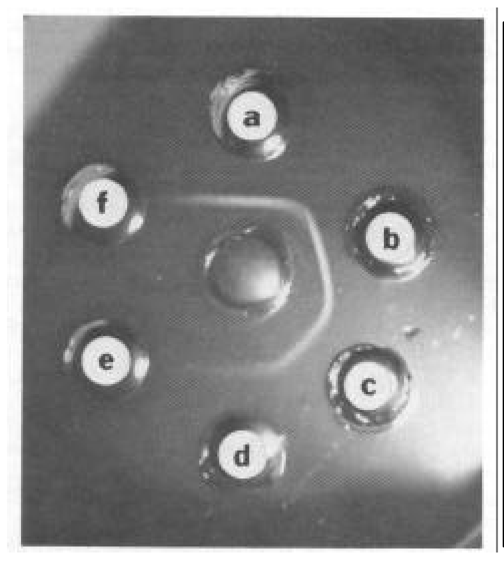
L'étude va maintenant porter sur un des mutants [ac-], appelé 18-7G, affecté au niveau du gène chloroplastique *rbcL* codant la grande sous-unité (sous-unité L) de la Rubisco.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

3.1. On a réalisé un test immunologique en double diffusion d'Ouchterlony sur la Rubisco de la souche sauvage et du mutant 18-7G. Le puits central contient un anticorps polyclonal dirigé contre l'holoenzyme de la Rubisco et les puits extérieurs contiennent des extraits protéiques solubles totaux. Puits a : sauvage (0, 8mg) ; b : sauvage (0, 4mg) ; c : sauvage (0, 2mg) ; d : sauvage (0, 1mg) ; e : mutant 18-7G (1,6 mg) ; f : mutant 18-7G (0, 8mg).



Interpréter.

3.2. La séquence nucléotidique du gène ***rbcL*** a été déterminée chez le sauvage et le mutant 18-7G. Les séquences sont identiques sauf dans la partie représentée ci dessous, donnée à partir du nucléotide 185 de la séquence codante du gène (le nucléotide 1 est le A de l'ATG initiateur). Les triplets représentent la phase codante.

base 185 ↓

sauvage : **…5' CA ACA GGT ACA TGG ACT ACA GTA TGG 3'…**

18-7G : **…5' CA ACA GGT ACA TAG ACT ACA GTA TGG 3'…**

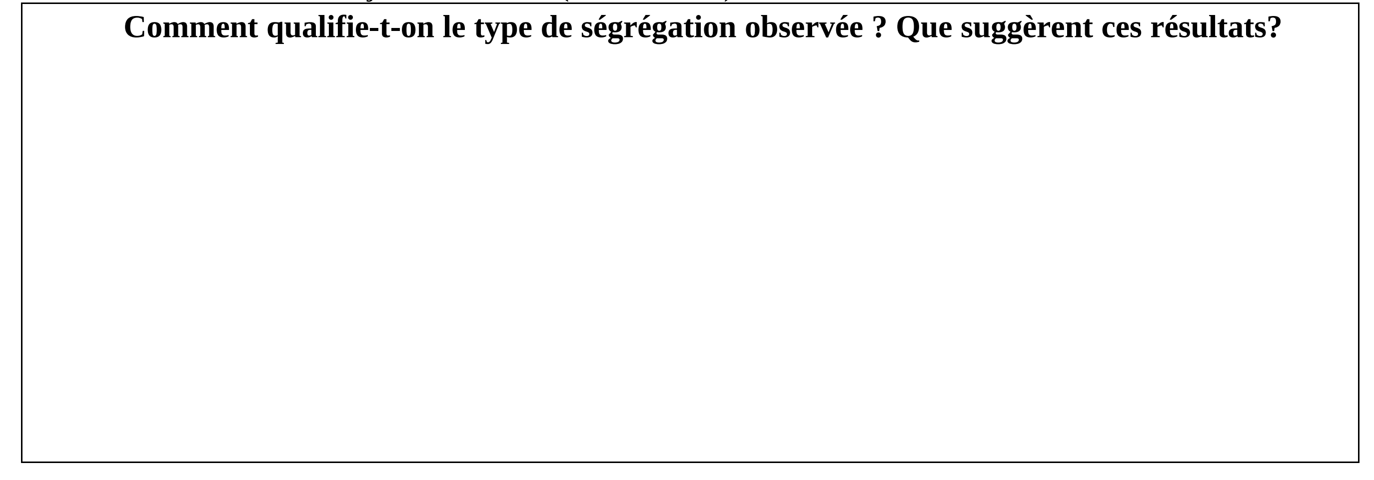
Caractériser la mutation. Quelles en sont les conséquences moléculaires précises sur la sous-unité L de la Rubisco ?

4. Etude de révertants.

On a constaté l'apparition spontanée et relativement fréquente de souches révertantes, c'est à dire de phénotype sauvage [ac+], à partir du mutant non photosynthétique 18-7G. L'étude portera sur un de ces révertants, nommé R13.

4.1. Instabilité du révertant R13.

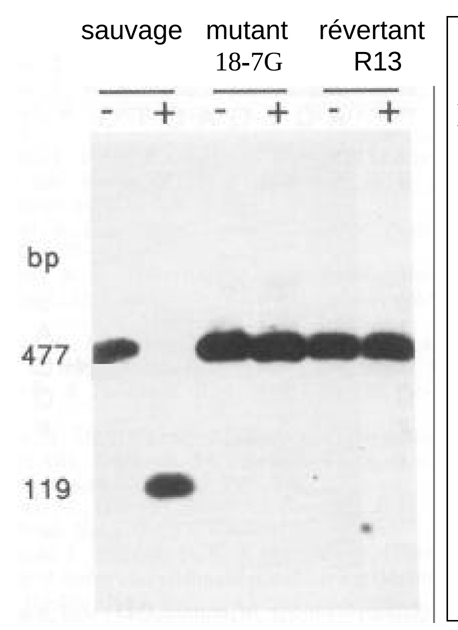
Le révertant R13 est particulièrement instable. En effet, lors des divisions végétatives à partir d'une seule cellule R13 [ac+], on obtient de façon reproductible des descendants [ac-] et des descendants [ac+]. Les descendants [ac-] sont stables et indiscernables du mutant original 18-7G. Les descendants [ac+] sont toujours instables (comme R13).



Comment qualifie-t-on le type de ségrégation observée ? Que suggèrent ces résultats?

4.2. Caractérisation moléculaire des révertants.

4.2.1. Un fragment de 577 pb couvrant la partie 5' du gène ***rbcL*** a été amplifié par PCR, puis digéré (+) ou non (-) par l'enzyme de restriction *Nla*III (qui clive l'ADN spécifiquement au niveau de la séquence CATG). Après électrophorèse, l'ADN a été hybridé avec une sonde homologue à la partie 3' du fragment amplifié. Les résultats sont les suivants :



1. Pourquoi a-t-on choisi l'enzyme *Nla*III?

2. Analyser les données d'hybridation. Que peut –on dire de l'origine de la réversion ?

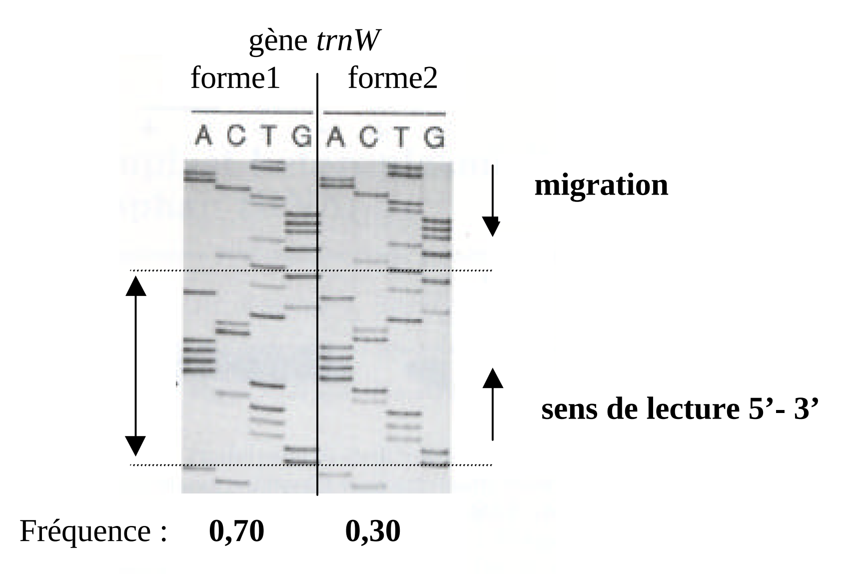
4.2.2. Par ailleurs, on s'est intéressé au gène chloroplastique *trnW*, codant l'ARNt spécifiant le tryptophane.

Plusieurs dizaines de clones de ce même gène ont été obtenus de façon indépendante à partir de la culture de la souche révertante R13, et leur séquence a été déterminée par la méthode de Sanger (méthode aux didésoxynucléotides).

Deux types de séquences sont obtenus de façon reproductible, à des fréquences reproductibles pour des cultures différentes. Elles diffèrent au niveau d'une seule région, celle qui porte l'anticodon de l'ARNt^{Trp}.

La figure ci-dessous représente l'autoradiographie de la portion du gel de séquence pour cette région.

Le brin dont la séquence est déterminée ici est le brin codant du gène *trnW*. Les fréquences indiquées correspondent à la fréquence respective de chaque forme. Les deux formes coexistent au sein d'un même chloroplaste. La forme 2 est la forme sauvage du gène.



1. Donner la séquence (dans le sens conventionnel 5'-3') de la région limitée par les lignes pointillées pour chacune des formes. Les comparer.

2. Connaissant le codon spécifiant « Trp », donner son anticodon sur l'ARNt. Repérer ce triplet sur la séquence du gène sauvage *trnW* déterminée dans la question précédente. Préciser l'orientation 5'-3' dans vos réponses.

3. En quoi la forme 1 peut-elle expliquer la réversion ?

4. Le génome chloroplastique porte un seul gène spécifiant l'ARNt^{Trp}. Une situation où la forme 1 du gène *trnW* serait la seule présente est-elle viable? Pourquoi ?

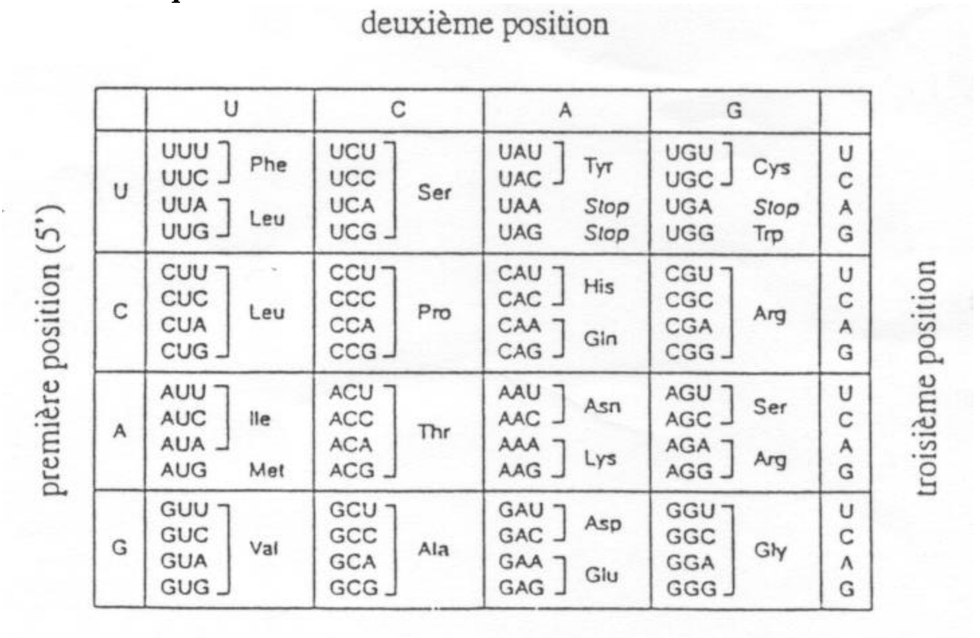
5. Proposer une synthèse des résultats de la partie 4 sous forme d'un texte bref et/ou de schémas.

Feuille à rendre impérativement à la fin de l'épreuve, même si le sujet n'est pas traité

Nom : Numéro de place :

Prénom : Numéro de salle :

Annexe 1 : Code génétique



deuxième position

première position (5')	U	C	A	G	troisième position
U	UUU UUC] Phe UUA UUG] Leu	UCU UCC UCA UCG] Ser	UAU UAC] Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU UGC] Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC CUA CUG] Leu	CCU CCC CCA CCG] Pro	CAU CAC] His CAA CAG] Gln	CGU CGC CGA CGG] Arg	U C A G
A	AUU AUC AUA] Ile AUG Met	ACU ACC ACA ACG] Thr	AAU AAC] Asn AAA AAG] Lys	AGU AGC] Ser AGA AGG] Arg	U C A G
G	GUU GUC GUA GUG] Val	GCU GCC GCA GCG] Ala	GAU GAC] Asp GAA GAG] Glu	GGU GGC GGA GGG] Gly	U C A G

Annexe 2 : Il est rappelé que la masse moléculaire moyenne d'un acide aminé est d'environ 110 Daltons.

Fin de l'énoncé